

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

9/720979
PCT/JP99/03552

日本特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

0107.99

REC'D 20 AUG 1999

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application: 1998年 7月 3日

出願番号
Application Number: 平成10年特許願第204333号

出願人
Applicant(s): 株式会社ディナベック研究所

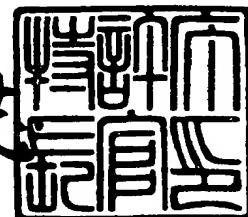
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 7月 22日

特許長官
Commissioner,
Patent Office

佐山 建志



出証番号 出証特平11-3051747

【書類名】 特許願
【整理番号】 D3-004
【提出日】 平成10年 7月 3日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N 15/86
【発明の名称】 神経細胞用（一）鎖RNAウイルスベクター
【請求項の数】 7
【発明者】
【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 株式会社ディナベック研究所内
【氏名】 福村 正之
【発明者】
【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 株式会社ディナベック研究所内
【氏名】 浅川 誠
【発明者】
【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 株式会社ディナベック研究所内
【氏名】 長谷川 譲
【特許出願人】
【識別番号】 595155107
【氏名又は名称】 株式会社ディナベック研究所
【代表者】 中富 博隆
【代理人】
【識別番号】 100102978
【弁理士】
【氏名又は名称】 清水 初志
【選任した代理人】
【識別番号】 100108774

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9716812

【書類名】 明細書

【発明の名称】 神経細胞用(−)鎖RNAウイルスベクター

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (−)鎖RNAウイルスベクターまたは該ベクターを含む細胞を神経細胞へ接触させる工程を含む、神経細胞へ核酸を導入するための方法。

【請求項2】 (−)鎖RNAウイルスベクターに含まれる核酸が外来遺伝子を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 外来遺伝子を一過的に発現させる、請求項2に記載の方法。

【請求項4】 神経細胞が中枢神経系の細胞である、請求項1から3のいずれかに記載の方法。

【請求項5】 (−)鎖RNAウイルスがパラミクソウイルス科に属するウイルスである、請求項1から4のいずれかに記載の方法。

【請求項6】 パラミクソウイルス科に属するウイルスがセンダイウイルスである、請求項5に記載の方法。

【請求項7】 請求項1から6のいずれかに記載の方法により、神経細胞へ核酸を導入するために用いられる、(−)鎖RNAウイルスベクター。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ウイルスベクター、詳しくは(−)鎖RNAウイルスベクターを用いることを特徴とする、神経細胞に対する遺伝子治療等に用いられる遺伝子導入法に関する。

【0002】

【従来の技術】

ヒトや動物に対する遺伝子治療において、高い効率で標的器官や標的細胞へ遺伝子が導入できる系を開発することは極めて重要な課題である。遺伝子を導入するためには用いられる方法には、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、陽イオンリポソーム法、エレクトロポレーション法などがあり、特にインビボ遺伝子導入法にはウイルスによる導入法、リポソームによる導入法、および直接導入法

が含まれる。中でも、ウイルスの遺伝子を組換えることにより得られる「ウイルスベクター」を用いて行われる遺伝子導入は、導入が容易で効率が高いために、遺伝子治療を含む細胞への遺伝子導入に極めて有用である。

【0003】

現在よく用いられるウイルスベクターには、レトロウイルスベクター、ヘルペスシンプレックスウイルス(HSV)ベクター、アデノウイルスベクター、およびアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)などがある。とりわけ、MRI、PETなどを利用した脳機能解析が進むに伴って、非分裂細胞である神経細胞へ効率よく感染し、導入遺伝子を高発現させることができるベクターが求められるようになり、アデノウイルスベクター、ヘルペスシンプレックスウイルス(HSV)ベクター、AAV、HIVなどが注目されるようになった。

【0004】

HSVは末梢神経系の神経節(ganglion)に遺伝子を導入することができる事が報告されているが、発現量の点で問題が残されている(Gene Therapy, 1995, 2:209-217)。HIVも神経細胞へ感染することが確認されている(Nature Biotechnology, 1997, 15:871-875)が、ウイルスゲノムが挿入される染色体上の位置が予測できなければ、挿入により正常遺伝子が損傷を受けたり、癌遺伝子を活性化したり、目的遺伝子が過剰発現したり発現が抑制されたりする可能性を否定できない。

【0005】

AAVはパーキンソン病(Exp. Neurol., 1997, 144:147-156)およびSly(スライ)病(A SGT meeting, 1998, 演題番号692)において、脳治療に使用されているが、パーキンソン病では、導入遺伝子が黒質にうまく運ばれないことが、またSly病においては脳内での発現が十分でないことが報告されている。

【0006】

アデノウイルスは、現在最も頻繁に使用されており、海馬CA領域に遺伝子導入が可能であると報告されている(Nature Medicine, 1997, 3:997-1004)。しかし、アデノウイルスには細胞毒性があり、抗原性が高いという欠点がある。

【0007】

一方、センダイウイルス等の(-)鎖RNAウイルスは染色体に挿入されることが

ないため、癌遺伝子等を活性化することはない。さらにRNAウイルスであるため、感染後からタンパク質発現までの時間が短く、またアデノウイルスと比較しても、はるかに高い導入遺伝子産物の発現量が得られるなどの利点を有している。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、神経細胞の遺伝子治療等に有用な、(一)鎖RNAウイルスベクターを用いた核酸の導入方法を提供することを課題とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明者らはまず、(一)鎖RNAウイルスの代表格であり、安全性や利便性の点からベクターとして遺伝子治療において有用であるセンダイウイルスを用いて種々の外来遺伝子を有する組換え体を製造し、これらの組換え体を利用して神経細胞や脳組織への外来遺伝子の導入を行った。その結果、これらの組換え体を利用することにより、効率よく外来遺伝子を神経細胞および脳組織に導入し得ることを見出した。さらに、本発明のウイルスベクターを用いると、極めて高いレベルで導入した外来遺伝子の発現が得られることを見出した。

【0010】

また、脳内へ導入された本発明のウイルスベクターは増殖を繰り返すことはなく、外来遺伝子を一定期間発現した後、発現が減少した。さらに、本発明のウイルスベクターを用いて、 β -グルクロニダーゼ欠損マウスの脳内へ遺伝子治療を実施したところ、該マウスの症状が改善された。このため、本発明者らは、調製したウイルスベクターが、導入した外来遺伝子の発現量を調節することが必要な神経性疾患の遺伝子治療において、効果的に機能し得ることを見出した。

【0011】

即ち、本発明は、

- (1) (一)鎖RNAウイルスベクターまたは該ベクターを含む細胞を神経細胞へ接触させる工程を含む、神経細胞へ核酸を導入するための方法、
- (2) (一)鎖RNAウイルスベクターに含まれる核酸が外来遺伝子を含む、(1)に記載の方法、

- (3) 外来遺伝子を一過的に発現させる、(2)に記載の方法、
- (4) 神経細胞が中枢神経系の細胞である、(1)から(3)のいずれかに記載の方法、
- (5) (-)鎖RNAウイルスがパラミクソウイルス科に属するウイルスである、
- (1)から(4)のいずれかに記載の方法、
- (6) パラミクソウイルス科に属するウイルスがセンダイウイルスである、(5)に記載の方法、
- (7) (1)から(6)のいずれかに記載の方法により、神経細胞へ核酸を導入するために用いられる、(-)鎖RNAウイルスベクター、

に関する。

【0012】

【発明の実施の形態】

本発明において、「(-)鎖RNAウイルスベクター」とは、(-)鎖RNAウイルスに由来し、感染力を有する複合体を含む。ここで「感染力」とは、本明細書においては、複合体が細胞への接着能および膜融合能を保持していることにより、細胞内に複合体内部の核酸等を導入することのできる能力のこととを言う。

【0013】

本発明において、(-)鎖RNAウイルスベクターは、例えば(-)鎖RNAウイルスを材料に用いて製造することができる。材料となるウイルスとしては、例えばパラミクソウイルス科の(Paramyxoviridae)のセンダイウイルス(Sendai virus)、ニューカッスル病ウイルス(Newcastle disease virus)、おたふくかぜウイルス(Mumps virus)、麻疹ウイルス(Measles virus)、RSウイルス(Respiratory syncytial virus)、牛痘ウイルス(rinderpest virus)、ジステンパーウイルス(distemper virus)、オルトミクソウイルス科(Orthomyxoviridae)のインフルエンザウイルス(Influenza virus)、ラブドウイルス科(rhabdoviridae)の水疱性口内炎ウイルス(Vesicular S)、狂犬病ウイルス(Rabies virus)等が挙げられる。

【0014】

例えば、センダイウイルスを用いる場合、ウイルスが自律的に複製するためには、NP、P/CおよびL遺伝子から作られるタンパク質群が必要だと考えられている

が、該タンパク質群をコードする遺伝子自体は、本発明のウイルスベクターに必ずしも含まれている必要なはい。例えば、本発明のベクターを、該タンパク質群をコードする遺伝子を有する宿主細胞を用いて製造し、該宿主細胞から該タンパク質群が供給されてもよい。また、これらのタンパク質群のアミノ酸配列は、ウイルス由来の配列そのまでなくとも、核酸の導入における活性が天然型のそれと同等かそれ以上ならば、変異を導入したり、あるいは他のウイルスの相同遺伝子で代用してもよい。

【0015】

また、例えばセンダイウイルスを用いる場合、伝播力を有するためにM、FおよびHN遺伝子から作られるタンパク質群が必要だと考えられているが、該タンパク質群をコードする遺伝子自体は、本発明のウイルスベクターに必ずしも含まれている必要なはい。例えば、本発明のベクターを、該タンパク質群をコードする遺伝子を有する宿主細胞を用いて製造し、該宿主細胞から該タンパク質群が供給されてもよい。また、これらのタンパク質群のアミノ酸配列は、ウイルス由来の配列そのまでなくとも、核酸の導入における活性が天然型のそれと同等かそれ以上ならば、変異を導入したり、あるいは他のウイルスの相同遺伝子で代用してもよい。

【0016】

外来遺伝子を神経細胞へ導入するには、外来遺伝子をウイルスゲノムに挿入した組換えウイルスゲノムを含む複合体を作製して用いることができる。組換えウイルスゲノムを含む複合体は、前記のいずれかのウイルスまたは組換え体ウイルスのcDNAを改変したものを試験管内または細胞内で転写させ、ウイルスを再構成させることによって得ることができる。このようなウイルス再構成は、既に開発されている（国際公開97/16539号参照）。

【0017】

また、完全なセンダイウイルスゲノムではなくても、DI分子（J.Virol. 68,841-8417,1994）などの不完全ウイルスや、合成したオリゴヌクレオチド等も複合体を構成する成分として用いることが可能である。

【0018】

センダイウイルスを材料に用いる場合、伝播力に関わるM、F、HN遺伝子の全ての遺伝子が含まれた複合体を使用することができる。しかし通常は、M、F、HN遺伝子の全てが含まれた複合体を脳内へ導入しても、脳内には、センダイウイルスが伝播力を有するために必要なFタンパク質を開裂させるプロテアーゼが存在しないため、ウイルス粒子形成後も伝播力を持たないと考えられる。ここで、「伝播力」とは、「感染や人工的な手法で核酸が細胞内に導入された後、細胞内に存在する該核酸が複製後、感染粒子またはそれに準ずる複合体を形成し、別の細胞に伝播することのできる能力」を意味する。しかし、より安全には、再構成された複合体に含まれるウイルスゲノムから、伝播力に関わる遺伝子を欠失または機能的に不活性化させておくことが好ましい。センダイウイルスの場合、伝播力に関わる遺伝子とは、M、F、および／またはHN遺伝子である。このような複合体の再構成法は既に開発されている（国際公開97/16538号参照）。例えばセンダイウイルスにおいて、再構成された複合体に含まれるウイルスゲノムから、Fおよび／またはHN遺伝子を欠失させたゲノムを有するベクターを作ることができ。このようなベクターも、本発明の神経細胞へ核酸を導入するためのベクターに含まれる。

【0019】

複合体には、例えば、エンベロープ表面に特定の細胞に接着しうるような接着因子、リガンド、受容体等が含まれていても構わない。組換え体(一)鎖RNAウイルスは、たとえば免疫原性に関する遺伝子を不活性化したり、RNAの転写効率や複製効率を高めるために、一部の遺伝子を改変したものでもよい。

【0020】

複合体に含まれるRNAは、適当な部位に外来性遺伝子を挿入することができる。所望のタンパク質を発現させるためには、所望のタンパク質をコードする外来性遺伝子を挿入する。センダイウイルスRNAにおいては、R1配列とR2配列との間に、6の倍数の塩基数を有する配列を挿入することが望ましい（Journal of Virology, Vol.67, No.8, 1993, p.4822-4830）。挿入した外来性遺伝子の発現量は、遺伝子挿入の位置、また遺伝子の前後のRNA塩基配列により調節しうる。例えば、センダイウイルスRNAにおいては、挿入位置がNP遺伝子に近いほど、挿入された

遺伝子の発現量が多いことが知られている。

【0021】

複合体に含まれるRNAにコードされた外来遺伝子は、この複合体を細胞に感染させることにより発現させることができる。実施例に示すように、センダイウイルスの再構成系を用いて作製した本発明の一態様としての複合体は、種々の神経細胞株に効率よく外来遺伝子を導入できることがわかった。また実施例5に示すように、外来遺伝子としてβ-グルクロニダーゼ遺伝子を有する本発明の一態様としての複合体は、レトロウイルスベクターを用いた場合よりも有意に高い発現量を示すことがわかった。このような特性を利用して、神経細胞への遺伝子導入に利用することが可能である。また本発明の一態様としての複合体は、実施例6に示すように、脳内への投与後、10日前後で発現が弱まるため、一定期間だけの発現が必要な遺伝子治療などに対し有用である。

【0022】

製造された複合体は、神経細胞へ接触させることによって、またはウイルスベクター産生細胞を直接神経細胞へ接触させることによって、複合体に含まれる核酸などの化合物を神経細胞へ導入することができる。脳内に投与する場合、例えば、麻酔開頭後、頭蓋骨に穴を開け、ガラス針等を用いて投与することができる。複合体には、外来遺伝子を含めることが可能である。外来遺伝子としては、神経細胞特異的遺伝子、アポトーシス抑制遺伝子、その他各種疾患治療用遺伝子など、あらゆる種類の遺伝子が挙げられる。また、特定の遺伝子の機能を阻害するようなアンチセンスDNAやリボザイムのような形態をとることも可能である。

【0023】

例えば、虚血における脳細胞の細胞死は、虚血直後に起こるのではなく、虚血後数日のうちに起こることがわかっている（*Neurosci. Lett.*, 1998, 240:69-72）。従って、このような時の脳細胞の細胞死を防ぐために、*bcl-2*などの細胞死を抑制する遺伝子を有する本発明の複合体を利用することができます。また、実施例6および8に示すように、本発明の複合体は、脳室内投与によって、上衣細胞および脳室に沿った細胞へ外来遺伝子を導入できる。外来遺伝子に分泌性タンパク質を産生する遺伝子を用いれば、髄液を伝って該タンパク質を海馬付近を含む脳

内に拡散させることも可能である。また、実施例7に示すように、海馬の錐体細胞へ投与し、該細胞で外来遺伝子を発現させることも可能である。また、実施例6および7に示すように、本発明の一態様としての複合体は、脳内への投与後、6日後も神経細胞において発現が認められ、複合体の導入により、細胞死が引き起こされることはなかった。このことは、本発明の複合体が、中枢神経の遺伝子治療に有用であることを示している。

【0024】

本発明の複合体の導入が可能な動物としては、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ウシ、サルなど全ての哺乳動物が挙げられる。

【0025】

【実施例】

以下実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0026】

【実施例1】 緑色蛍光タンパク質(GFP)遺伝子および β -グルクロニダーゼ遺伝子を付加型に保持するセンダイウイルス(SeV)の作製

SeV転写ユニットpUC18/T7HVJRz.DNA(+18)(Genes Cells, 1996, 1:569-579)の制限酵素NotI開裂部位に、緑色蛍光タンパク質(GFP)遺伝子(構造遺伝子長717bp)に転写開始(R1)と終結(R2)シグナルと介在(IG)配列を付加したNotI断片をPCRにより増幅させ、導入した(図1)。同様の方法で β -グルクロニダーゼ遺伝子(構造遺伝子長1953bp)に転写開始(R1)と終結(R2)シグナルと介在(IG)配列を付加し pUC18/T7HVJRz.DNA(+18)の制限酵素NotI開裂部位に導入した(図1)。既知の方法(Genes Cells, 1996, 1:569-579)に従い、LLCMK2細胞および発育鶏卵を用いて上述の各遺伝子を含むウイルスの再構築を行った。その結果、目的の遺伝子を含むウイルスを回収することが出来た(以下緑色蛍光タンパク質(GFP)遺伝子を発現するSeVを「GFP-SeV」、 β -グルクロニダーゼ遺伝子を発現するSeVを「Sly-SeV」と称する。)

【実施例2】 「GFP-SeV」の確立された神経細胞株への感染性の確認

確立された細胞株として、ラット副腎髓質褐色細胞種(PC12)、ヒトのニューロ

プラストーマ細胞(IMR-32)およびヒトのグリオプラストーマ細胞(A172)を用いた。PC12細胞の培養は終濃度5%になるようにウマ血清および仔ウシ血清をそれぞれ添加したDMEM培地により行った。神経突起を伸長させるために神経成長因子(NGF7S)を終濃度が50ng/mlになるように添加した。ヒトのニューロプラストーマ細胞(IMR-32)の培養には10%仔ウシ血清を含むMEM培地に、終濃度が1mMおよび0.1mMになるようにMEMピルビン酸ナトリウム溶液およびMEM非必須アミノ酸溶液を添加した培地を使用した。ヒトのグリオプラストーマ細胞(A172)の培養には10%仔ウシ血清を含むMEM培地(高グルコース)を用いた。

【0027】

PC12への感染実験は、直径6cmプレートに105個の細胞をNGFを含む培地に植え3日間培養し神経突起の伸長した細胞を用いて行った。培地を除去後、細胞をPBSで1回洗浄した。1%ウシ血清アルブミンを含む500μlのPBSに106 plaque forming unit(p.f.u.)となるように「GFP-SeV」を希釈し細胞に加え、細胞が乾燥しないように20分間ウイルスを感染させた。感染後、プレートに培地を5ml加え、細胞を2日間培養した。培養後、蛍光実体顕微鏡下でGFPの蛍光を観察した。その結果、「GFP-SeV」がPC12細胞に感染し細胞内でGFPの蛍光を発することを確認した。コントロールのGFP遺伝子を保持しないSeV感染細胞および非感染細胞では蛍光を認めることが出来なかった。

【0028】

IMR-32細胞を直径10cmプレートに3×105個の細胞を所定の培地に植え、1晩培養した。培養後の細胞数を6×105個と見積もり、多重感染度(m.o.i.)が10になるように「GFP-SeV」を1%ウシ血清アルブミンを含む1000μlのPBSに希釈した。ウイルスを20分間感染させ、所定培地で12および36時間培養を行った。蛍光実体顕微鏡下でGFPの蛍光を観察した。12時間後では、「GFP-SeV」感染細胞の細胞体において蛍光が認められた。36時間後には細胞体の他に突起部位においてもGFPの蛍光が認められた。コントロールのGFP遺伝子を保持しないSeV感染細胞および非感染細胞では蛍光を認めることが出来なかった。

【0029】

A172細胞においてもIMR-32細胞と同様な方法で感染させた。「GFP-SeV」感染

細胞の細胞体において蛍光が認められた。コントロールのGFP遺伝子を保持しないSeV感染細胞および非感染細胞では蛍光を認めることが出来なかった。

【0030】

「GFP-SeV」は今回用いたいずれの確立された神経細胞株にも感染し、細胞内でGFP遺伝子よりGFPを発現させることに成功した。これによりSeVが初代脳細胞およびインビボ投与での脳細胞へ感染する可能性があることを示唆した。

【0031】

[実施例3] ラットの初代脳細胞の培養

妊娠18日SDラットをジエチルエーテルにより深麻酔し、腋下動脈放血により安樂死させた。下腹部を95%エタノールで消毒後、開腹し子宮ごと胎児を摘出した。以後の操作は無菌的に氷上で行い、温度指定のない溶液はすべて氷温のものを使用した。丸ピンセットとハサミを用いて子宮から胎児を摘出し、20mlの作業液(DMEM50%, PBS50%)入りプレートに移した。胎児を滅菌ガーゼ上に置き、INOX#4ピンセット2本を用いて皮膚頭蓋を正中に沿って切り開き、INOX#7ピンセットを脳組織下面に沿って差入れ、延髄を断ち切りながら脳組織全体をすくい上げて脳を取り出し作業液に入れた。実体顕微鏡下で、メス2本を用いて作業液中の脳を3枚におろし脳幹を分離し海馬、線条体を含む大脳半球2個を丸ピンセットで別の作業液に移した。実体顕微鏡下で、INOX#5ピンセット2本を用いて脳組織表面の髄膜を残さず除去し、洗浄のため丸ピンセットで別の作業液に移した。大脳半球6個を丸ピンセットで保存液(DMEM(5%ウマ血清および5%仔ウシ血清を含む)90%、DMSO10%)に入れ、メスで1mm以下に細切した。切断した組織片を1.5ml程度の保存液と共に冷却しておいた凍結用チューブにいれ、フリージングコンテナーに格納し、3時間かけ緩速凍結を行い液体窒素に保存した。大脳半球6個分の組織片を液体窒素より取り出し32℃で解凍した。組織片を氷冷した8mlの作業液で2回洗浄した。30秒間静置し上清を除去した。濾過滅菌し氷温冷却したパパイン溶液(パパイン1.5U、システイン0.2mg、ウシ血清アルブミン0.2mg、グルコース5mg、DNase0.1mg/ml)を5ml加え、32℃15分間加温した。5分毎に転倒攪拌した。上清をとり20%仔ウシ血清入り溶液を5ml加えた。沈殿画分に32℃に加温したパパイン溶液を5ml加え更に15分間加温した。5分毎に転倒攪拌した。上清が十分に濁り、

組織片が半透明になったことを確認してからピペッティングを行い組織片をばらばらにした。32℃に加温しておいた、1回目の上清画分を試料液に加え、あらかじめ32℃に温めておいた遠心機で遠心(1200rpm、5分間)した。上清を除きDMEM(5%ウマ血清および5%仔ウシ血清を含む)を5ml加え攪拌し細胞をほぐし、前述の条件下で遠心を行った。上清を除き2mlのDMEM(5%ウマ血清および5%仔ウシ血清を含む)を加え攪拌した。細胞数計測を行った結果、細胞数は 5×10^6 cells/mlであった。ポリエチレンイミンコーティングされたプレート上に得られた初代脳細胞を捲き培養を行った。

【0032】

[実施例4] SeVの初代脳細胞への感染性の「GFP-SeV」による確認

実施例3により得られた初代脳細胞を直径10cmプレート上で3日間培養した。上清を除去し、「GFP-SeV」を1%ウシ血清アルブミンを含む1000μlのPBSに希釈した試料溶液を加え、ウイルスを20分間感染させた。感染後、プレートにDMEM(5%ウマ血清および5%仔ウシ血清を含む)培地を10ml加え、細胞を2日間培養した。培養後、蛍光実体顕微鏡下でGFPの蛍光を観察した。ほとんどの細胞が蛍光を呈した。すなわち、初代脳細胞にもSeVが感染することが確認された。

【0033】

[実施例5] β-グルクロニダーゼ遺伝子欠損ヒト線維芽細胞での「Sly-SeV」の感染とβ-グルクロニダーゼの発現

本発明の実施には、β-グルクロニダーゼ遺伝子欠損ヒト線維芽細胞(以下Sly線維芽細胞と称する)および正常ヒト線維芽細胞を使用した。

【0034】

Sly病はムコ多糖症の1つであり、リソソーム酵素の1つであるβ-グルクロニダーゼ欠損により引き起こされる。臨床的には多様な症候を呈する。胎児水腫を伴う重症型から軽症型まであるが、乳児期から発症する重症例が多い。特有な顔貌、肝脾腫、精神運動発達遅滞、骨変形などである。

【0035】

β-グルクロニダーゼがリソソームに運搬されるためには、小胞体およびゴルジ体で糖鎖付加さらにマンノースの6位がリン酸される必要が示唆されている。

リソソームに運搬されるとC-末端がプロテオリシスを受ける。

【0036】

本発明の実施に際して 1) 「Sly-SeV」がヒト線維芽細胞に感染するかどうか、 2) 発現量はどのくらいであるか、 3) リソソームに運搬される分子種が存在するかどうかを検定した。

【0037】

1) Sly線維芽細胞を6ウエルプレートに細胞数が105となるよう調製した。「Sly-SeV」をm.o.i.が5になるように1%ウシ血清アルブミンを含む $100\mu l$ のPBS溶液に希釈し、前日より培養したSly線維芽細胞に1時間ウイルスを感染させた。血清を含まないMEM培地中で、24時間培養した。培養した細胞をホルマリン、アセトン(1:7)混合液で固定した。基質にナフトールAS-BIグルクロニドを用い、基質の分解をpH5.0の酢酸緩衝液中、37℃で行い、赤色呈色により基質分解を観察した。その結果、「Sly-SeV」を感染させたSly線維芽細胞の細胞質が赤く染色された。これは「Sly-SeV」がSly線維芽細胞に感染し、導入遺伝子を発現したことを示すものである。

【0038】

2) Sly線維芽細胞を6ウエルプレート上で細胞数が105となるよう調製した。「Sly-SeV」をm.o.i.が0.1および1.0になるように1%ウシ血清アルブミンを含む $10\mu l$ のPBS溶液に希釈し、前日より培養したSly線維芽細胞に1時間ウイルスを感染させた。血清を含まないMEM培地中で、24時間および48時間培養した。所定の時間培養後、細胞を回収し超音波処理により細胞内画分を調製した。4-メチルウンベリフェニル- β -D-グルクロニドを基質とし、分光蛍光光度計で蛍光強度を測定することにより4-メチルウンベリフェロン(MU)の量を測定した。その結果を表1に示す。表中、発現量は、1mgの細胞内画分タンパク質が1時間に生成する4-メチルウンベリフェロン(MU)の量で表した。

【0039】

【表1】

| 細胞 | 感染条件 | 発現量 | |
|----------|--------------------------|-----------------------|--|
| | | (nmol MU/mg 全タンパク質/時) | |
| Sly線維芽細胞 | 感染なし | 53 | |
| 正常線維芽細胞 | 感染なし | 276 | |
| Sly線維芽細胞 | Sly-retro | 911 | |
| Sly線維芽細胞 | Sly-SeV(m.o.i.=0.1,24時間) | 15,900 | |
| Sly線維芽細胞 | Sly-SeV(m.o.i.=1.0,24時間) | 27,100 | |
| Sly線維芽細胞 | Sly-SeV(m.o.i.=0.1,48時間) | 21,100 | |
| Sly線維芽細胞 | Sly-SeV(m.o.i.=1.0,48時間) | 32,300 | |

表1に示すように「Sly-SeV」感染細胞の発現量は、15,900～32,300(nmol MU/mg 全タンパク質/時)であり。正常線維芽細胞では276、レトロウイルスでβ-グルクロニダーゼを発現させた場合(Sly-retro)は911であった。SeVが感染細胞中で、導入タンパク質を強く発現させることが判った。

【0040】

3) 上記2) で得られた画分を「Sly-SeV」感染β-グルクロニダーゼ欠損線維芽細胞内画分とした。培養上清画分として培養上清中に含まれるタンパク質を冷却アセトンで沈殿させ回収した。得られた試料を抗ヒトβ-グルクロニダーゼ抗体を用いたウエスタンプロッティングに供した。その結果、「Sly-SeV」感染β-グルクロニダーゼ欠損線維芽細胞内画分には、抗ヒトβ-グルクロニダーゼ抗体に反応する、高および低分子の2つのタンパク質が認められた。低分子量のバンドは、正常線維芽細胞で抗ヒトβ-グルクロニダーゼ抗体に反応するタンパク質と同じ分子量のものであり、リソソームに運搬されたβ-グルクロニダーゼのC-末端がプロテオリシスを受けた分子種であると考えられる。高分子タンパク質は正常線維芽細胞では認められず、「Sly-SeV」感染β-グルクロニダーゼ欠損線維芽

細胞内および「Sly-SeV」感染 β -グルクロニダーゼ欠損線維芽細胞上清画分に認められた。上清画分は高分子量のタンパク質のみであった。高分子のタンパク質種は「Sly-SeV」感染による β -グルクロニダーゼ発現が高すぎるために、リソソームへの輸送が追いつかずミクロソーム又は細胞外に分泌されたものと考えられる。あるいは、分子量からみて、糖鎖は付加されているがマンノースの6位がリン酸化されず、リソソームへ輸送されない分子種である可能性も考えられる。

【0041】

「Sly-SeV」感染 β -グルクロニダーゼ欠損線維芽細胞内画分に、リソソームへ輸送されると推測されるヒト β -グルクロニダーゼを発現させることが出来た。

【0042】

[実施例6] 脳室内投与による「GFP-SeV」の発現

8-10週令B-6マウスの後頭部より27Gの注射針を用いて「GFP-SeV」を投与した。この方法によるウイルスの投与部位は、剖検後の注射針痕から右側脳室であると推測された。投与「GFP-SeV」容量は20~30 μ lとし、その試料溶液に含まれるウイルス数は1~1.5×10⁷p.f.u.であった。コントロールとしてGFP遺伝子を含まないSeV、PBSを投与した。投与後、3、5、7、10日後に剖検し、脳全体を取り出し脳を正額断に切断した。実体蛍光顕微鏡下でGFPの蛍光を観察した。「GFP-SeV」投与3日後の剖検切開脳において顕著なGFPの蛍光が認められた。その正額断組織の脳室に沿った部位において、鮮明なGFPの蛍光が認められた(図2)。後の実施例8でも述べるが、GFPの蛍光を呈するSeV感染細胞は上衣細胞であると考えられた。感染5、7日後の側脳室にそった細胞も、蛍光を呈した。しかし、7日後の細胞では蛍光の程度はかなり小さくなっていた。10日後には蛍光を呈する脳細胞を認めることが出来なかった。コントロールとしてGFP遺伝子を含まないSeV、PBSを投与したマウス脳においては蛍光を認めることが出来なかった。

【0043】

[実施例7] 定位脳手術脳実質への「GFP-SeV」の投与

本発明の主な目的である神経細胞、特に海馬の錐体細胞へのSeVの感染を調べるために正確に海馬付近にSeVを投与することが求められる。定位脳手術により脳実質にSeVを導入し、SeVの脳実質細胞への感染を調べた。実験動物として1

) マウス、2) ラットを用いた。

【0044】

1) マウスでは正確なステレオ図がないので、海馬に正確に投与することは困難である。麻酔開頭後、正中より左右2mm、ブレグマより前方3mmの頭蓋骨の位置に歯科用ドリルで直径1mmの穴を開け、深さ右3.5mm左2.5mmの実質部分位にガラス針を用いて「GFP-SeV」を $1.5\mu l$ 投与した。閉頭3日後に開頭し、GFPの発現を調べた。実質部分でGFPの発現が認められた。エタノール固定後、凍結切片を作製した。エタノール固定後の凍結切片では発色団の流出によりGFPの蛍光はかなり減衰されたが、蛍光を呈する部位が認められた。内包付近の白質中で、エタノールでミエリンタンパク質が溶出した軸索においてGFPの蛍光が認められた。さらに線条体付近と推測される部位の軸索においてもGFPの蛍光が認められた。

【0045】

この結果、「GFP-SeV」はマウス脳の神経細胞に感染することが示された。

【0046】

2) ラットでは正確なステレオ図があり、正確に海馬CA1領域の錐体細胞付近に「GFP-SeV」を投与出来る。体重170g前後のラットを、麻酔開頭後、正中より左右2mm、インターナル(シグマ)より前方4.5mmの頭蓋骨の位置に歯科用ドリルで直径1mmの穴を開け、深さ右3.5mm左2.5mmの実質部分位にガラス針を用いて「GFP-SeV」を $1.5\mu l$ 投与した。閉頭3日後に開頭し、GFPの発現を調べた。その結果、深さ2.5mm投与で海馬CA1錐体細胞領域でGFPの発現が認められた。海馬付近を蛍光顕微鏡により拡大して観察すると、海馬CA1錐体細胞の細胞体および樹状突起で顕著な蛍光を呈した。投与6日後の錐体細胞でも発現が観察された。投与6日後でも、GFPの発現が錐体細胞の細胞体および樹状突起で認められた。これはSeV感染6日後でも神経細胞死を引起さないことを示すものであり、脳虚血後の細胞脱落死を防御するための遺伝子治療用ベクターとして活用できることを強く示唆するものである。

【0047】

[実施例8] β -グルクロニダーゼ欠損マウス(Slyマウス)による遺伝子治療の試み

実施例6で示したようにSeVは脳室投与で上衣細胞に感染することが示唆されたので、「Sly-SeV」をSlyマウス（J.Clin.Invest.,1989,83:1258-1266）の脳室に投与し、感染細胞より脳室にβ-グルクロニダーゼを髄液中に分泌させ標的細胞に取込まれ、症状改善を図った。

【0048】

Slyヘテロマウスの交配により得られたマウスの尾のβ-グルクロニダーゼ活性測定と染色体上のβ-グルクロニダーゼ遺伝子欠損部位のPCR増幅断片の制限酵素NlaIV切断の有無により、得られた個体からSlyホモマウスを選択し今回の実験に供した。投与方法は実施例6に準じて行った。投与3日および12日後に脳を取り出し、凍結切片を作製した。組織でのβ-グルクロニダーゼ活性は実施例5の1）の方法の変法を用いて調べた。図3で示すように脳室に沿ってβ-グルクロニダーゼ発現部位が強く赤色に染め出された。顕微鏡により拡大して観察すると側脳室の上衣細胞で強くβ-グルクロニダーゼが発現し、しかも細胞外に分泌されていることが確認された。投与12日後切片上（図4）で、側脳室の上衣細胞で発現し分泌されたβ-グルクロニダーゼが、髄液の移動により脳室内に広がり、海馬付近まで到達していることが判った。投与により外見上Slyホモマウスの運動能力が向上した。

【0049】

【発明の効果】

本発明により、従来では困難だった中枢神経系組織を含む神經細胞に遺伝子を導入する方法が提供された。本発明の方法を利用することにより、遺伝子治療等を行う際に、効率的に遺伝子を導入することが可能となった。

【図面の簡単な説明】

【図1】

GFPおよびSly遺伝子などの外来遺伝子を含む付加型センダイウイルス（SeV）の構築法を示す図である。NotI部位を付加したプライマー1および、転写開始配終結シグナル(R2)、介在配列(IG)、転写開始配列(R1)配列、およびNotI部位を含むプライマー2を用いて、外来遺伝子のORFをPCRにて増幅し、pUC18/T7HVRz.DNA(+18)のNotI部位に挿入する。

【図2】

GFP遺伝子を有するセンダイウイルス(「GFP-SeV」)を感染させたマウス脳でのGFPの発現を示すマウス脳正頸断面図である。

【図3】

Sly遺伝子を有するセンダイウイルス(「Sly-SeV」)を感染させたSlyマウスの、感染3日後の側脳室での β -グルクロニダーゼの発現を示す脳断面図である。

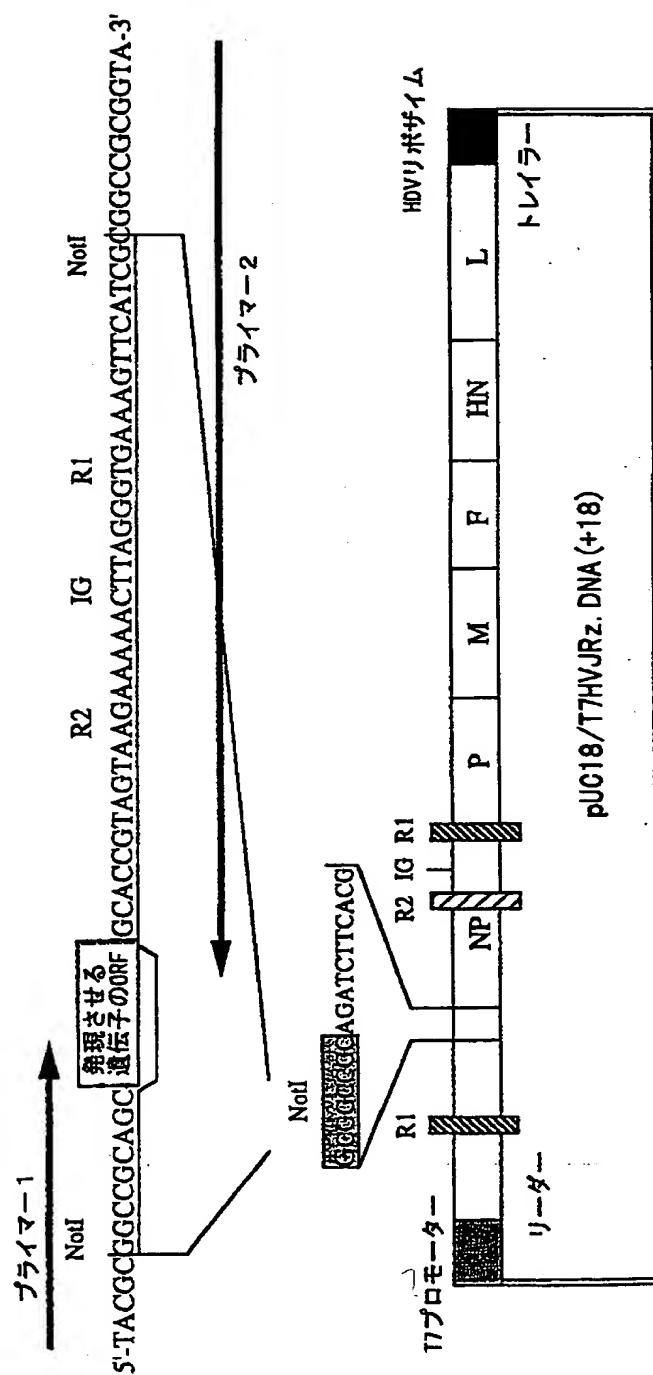
【図4】

A : Sly遺伝子を有するセンダイウイルス(「Sly-SeV」)を感染させたSlyマウスの、感染12日後の側脳室での β -グルクロニダーゼの発現(棒で囲った部分)を示す脳断面の切片である。B : Aの隣接切片のLorbacher法による染色像である。

【書類名】

図面

【図1】



特平10-204333

【図2】

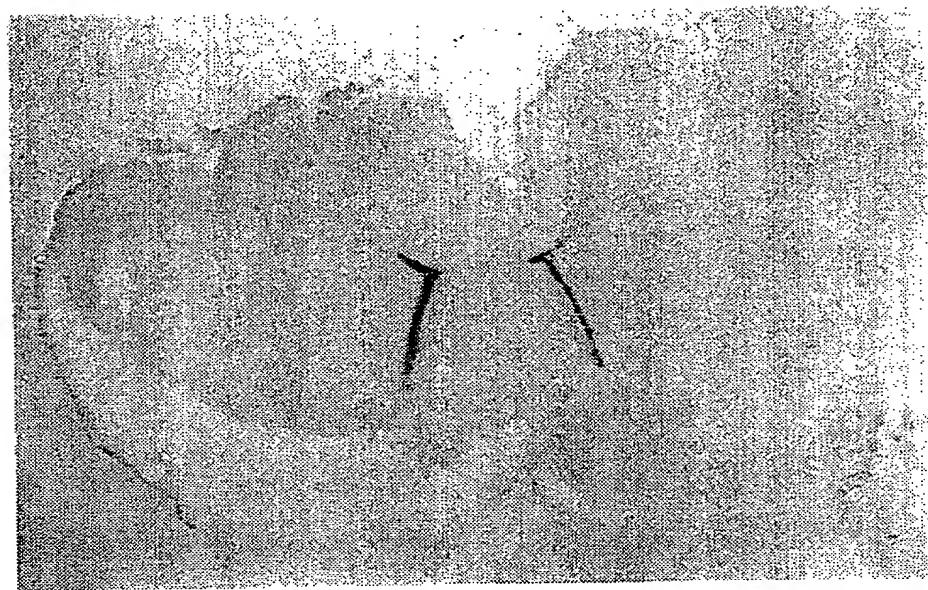
図面代用写真



特平10-204333

【図3】

図面代用写真

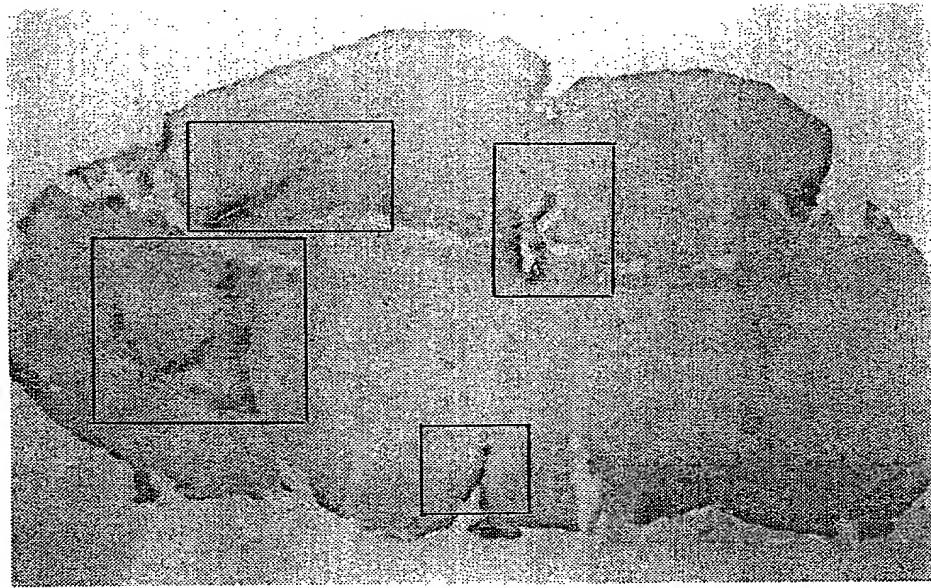


特平10-204333

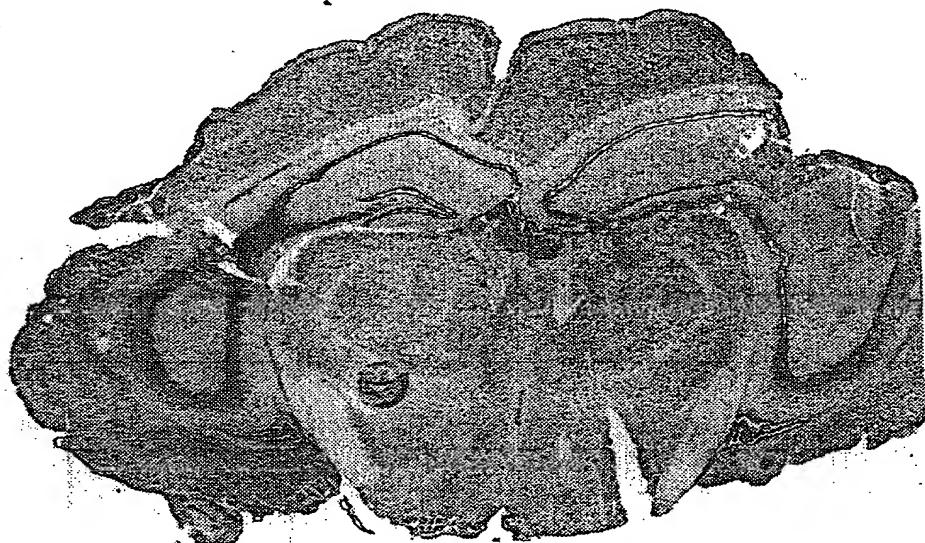
【図4】

A

図面代用写真



B



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 神経細胞の遺伝子治療等に有用な、(一)鎖RNAウイルスベクターを用いた核酸の導入方法を提供することを課題とする。

【解決手段】 (一)鎖RNAウイルスベクターを用いることにより、神経細胞へ核酸を導入することが可能となった。本発明の方法を利用することにより、遺伝子治療等を行う際に、効率的に中枢神経系組織を含む神経細胞へ遺伝子を導入することが可能となった。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 595155107

【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号

【氏名又は名称】 株式会社ディナベック研究所

【代理人】

【識別番号】 100102978

【住所又は居所】 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階

清水国際特許事務所

【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

【住所又は居所】 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階

清水国際特許事務所

【氏名又は名称】 橋本 一憲

出願人履歴情報

識別番号 [595155107]

1. 変更年月日 1995年11月 1日

[変更理由] 新規登録

住 所 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号

氏 名 株式会社ディナベック研究所

THIS PAGE BLANK (USPTO)